Aus dem Institut für Veterinär-Hygiene
des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

Direktor: Prof. Dr. H. Hartwigk

VERGLEICH DES INTRACUTANTESTES AM MEERSCHWEINCHEN MIT DEM I. V. - UND DEM I. P. - TEST (LETALTEST) AN DER MAUS BEI VERWENDUNG VON ALPHA-TOXINHALTIGEN KULTURFILTRATEN DES CLOSTRIDIUM (CL.) WELCHII (PERFRINGENS) TYP A

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Veterinärmedizin
an der
Freien Universität Berlin

Vorgelegt von
Claus-Norbert Fink
Tierarzt aus Molchow

Berlin 1971
Journal-Nr. 755

Aus dem Institut für Veterinär-Hygiene
des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

Direktor: Prof. Dr. H. Hartwigk

VERGLEICH DES INTRACUTANTESTES AM MEERSCHWEINCHEN MIT DEM I. V. - UND DEM I. P. - TEST (LETALTEST) AN DER MAUS BEI VERWENDUNG VON ALPHA-TOXINHALTIGEN KULTURFILTRATEN DES CLOSTRIDIUM (CL.) WELCHII (PERFRINGENS) TYP A

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Veterinärmedizin
an der
Freien Universität Berlin

Vorgelegt von
Claus-Norbert Fink
Tierarzt aus Molchow

Berlin 1971
Journal-Nr. 755

Gedruckt mit Genehmigung
des Fachbereiches Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

Vorsitzender:	Prof. Dr. J. Boch
Referent :	Prof. Dr. H. Hartwigk
Korreferent :	Prof. Dr. H.-J. Sinell

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Tag der Promotion: 13. Juli 1971

Meiner Frau in Dankbarkeit gewidmet

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41547205_0081

Inhaltsverzeichnis

		Seite
I.	EINLEITUNG	7
II.	LITERATUR	8
	1. Eigenschaften des alpha-Toxins	8
	2. Wachstumseigenschaften des Cl. welchii Typ A und Einfluß des Kulturverfahrens auf die alpha-Toxinproduktion	10
	3. Wirkungsmechanismus des alpha-Toxins	11
	4. Testungen des alpha-Toxins am Tier	14
	5. Andere Nachweismethoden des alpha-Toxins	16
III.	EIGENE UNTERSUCHUNGEN	19
	1. Aufgabenstellung	19
	2. Material und Methoden	20
	3. Ergebnisse	24
	1. Bio-mathematische Erläuterungen	24
	2. Darstellung der Ergebnisse in Tabellen und Abbildungen	27
IV.	BESPRECHUNG	45
V.	ZUSAMMENFASSUNG	50
VI.	LITERATURVERZEICHNIS	52

I. Einleitung

Aus den in- und ausländischen Arbeiten, die sich mit der Differenzierung des Clostridium welchii befassen, ist nicht klar zu ersehen, welche Methode zum Erkennen der von den verschiedenen Stammtypen des Cl. welchii gebildeten Toxine die zuverlässigste ist.

Nach Smith und Holdeman (1968) soll der Mäuseletaltest bevorzugt verwendet werden, wobei die toxinhaltigen Kulturfiltrat-Antitoxin-Gemische entweder mittels i.p.- oder i.v.-Injektionen zu applizieren sind.

Nach Willis (1969), Wellcome (1970) und Batty (1970) wird zur Bestimmung der von den fünf Welchii-Typen gebildeten Toxine der intracutane Neutralisationstest am Meerschweinchen empfohlen. Dabei werden Gemische von toxinhaltigen Kulturfiltraten und Antiseren der Typen A - E in einer Dosis von 0,2 ml in die Meerschweinchenhaut injiziert. Die Bevorzugung des Intracutantestes wird damit begründet, daß der Meerschweinchentest zu weniger variablen Ergebnissen führt. Wenn man bedenkt, daß einem Meerschweinchen insgesamt 14 - 20 verdünnte oder behandelte Kulturfiltrate oder Filtrat-Antitoxin-Gemische injiziert werden können, die im Mäuseversuch an eine größere Zahl von Mäusen verimpft werden müßten, so ist einleuchtend, daß ein einzelnes Tier als Reaktionskörper eventuell den Vorzug verdient.

Oft wird zwischen der nekrotisierenden und der letalen Eigenschaft der einzelnen Toxine des Cl. welchii unterschieden, wobei unklar bleibt, ob die nekrotisierende und die letale Eigenschaft bei den Welchii-Toxinen identisch oder verschieden sind.

Mir wurde die Aufgabe gestellt, an Typ-A-Kulturfiltraten gleicher Chargen vergleichende Untersuchungen über den Mäuseletaltest bei i.v.- und i.p.-Injektion und den Intracutantest am Meerschweinchen durchzuführen.

II. Literatur

Da zu den Versuchen ausschließlich ein Standard-Stamm des A-Types des Cl. welchii verwendet wurde, seien einige Bemerkungen über die Wirkungen des Alpha-Toxins vorausgeschickt.

1. Eigenschaften des alpha-Toxins

Das alpha-Toxin gehört zu den Majortoxinen, das heißt zu den Toxinen, die für die Differenzierung der fünf Typen des Cl. welchii die größte Bedeutung haben. Es wird von allen fünf Typ-Stämmen des Cl. welchii - in den größten Mengen jedoch von den A-Stämmen - gebildet. Das Toxin wirkt enzymatisch; es hydrolysiert Lecithin unter Bildung von Phosphorylcholin und einem wasserunlöslichen Diglyzerid.

Glenny et al. (1933) konnten durch monovalente Antiseren zeigen, daß die letale, nekrotische und hämolysierende Eigenschaft von Typ A-Kulturfiltraten in der Hauptsache durch das alpha-Toxin bedingt sind.

Nagler (1939) und Seifert (1939) wiesen unabhängig voneinander nach, daß Kulturfiltrate aller Typen eine Undurchsichtigkeit (Opaleszenz) des Menschenserums verursachen. Dieser Effekt konnte durch alpha-Antitoxin enthaltende Seren verhindert werden und wurde mit dem Schutzeffekt gegen die Letalaktivität des alpha-Toxins für Mäuse in Parallele gesetzt.

Macfarlane, Oakley und Anderson (1941) bestätigten dieses Ergebnis von Nagler und Seifert, stellten jedoch fest, daß eine stärkere Reaktion mit den Cl. welchii-Kulturfiltraten erzielt werden konnte, wenn sie statt des Menschenserums eine Eidotteremulsion verwendeten. Sie erkannten außerdem, daß nur ein einziger Faktor für den Nagler-Effekt in normalem Menschenserum, den Eidotteremulsionseffekt sowie die Schaferythrozytenlysis in vitro verantwortlich zu machen war.

Den letzten Beweis dafür, daß diese verschiedenartigen, biochemischen Aktivitäten nur eine Ursache haben, erbrachten Macfarlane und Knight (s.o.). Sie zeigten, daß ein Abbau von Lecithin durch das alpha-Toxin bewirkt wird und daß die Lecithinase-Reaktion beim Menschenserum und bei der Eidotteremulsion sowie der Letal-Effekt bei Mäusen parallel laufen. Dabei bedienten sie sich des Neutralisationsversuches mit einer Anzahl von alpha-Antitoxinseren.

Das alpha-Toxin ist am stabilsten bei pH 7,0 bis 8,0. Nur unter sehr sauren oder alkalischen Bedingungen verliert es an Wirksamkeit. Nach einer fünfstündigen Aufbewahrung unter pH 5,3 besaßen die rohen Filtrate noch 96% ihrer hämolytischen Aktivität, während sie bei pH 9,1 nach fünf Stunden noch zu 81% wirksam waren. (Gale und V. Heyningen; 1942)

Das alpha-Toxin ist ziemlich hitzestabil und verliert etwa die Hälfte seiner Aktivität nach fünfminütiger Erhitzung bei 100°C (Mason; 1941 / Smith und Gardener; 1950). Die Hitzeinaktivierung in Anwesenheit von Calcium- und Phosphationen verläuft ungewöhnlich, denn das Toxin verliert durch Bildung eines Komplexes mit diesen Ionen binnen weniger Minuten bei 60°C - 70°C seine Wirksamkeit; wenn es danach kurzzeitig auf 100°C erhitzt wird, wird das Toxin durch Sprengung des Komplexes wieder frei, so daß es seine Aktivität zum Teil wiedererlangt.

Nach Smith und Gardener (s.o.) können mittlere Konzentrationen reduzierender Substanzen, wie Thioglykolsäure, Cystein usw. das alpha-Toxin irreversibel inaktivieren. Auch Trypsin soll auf das alpha-Toxin eine inaktivierende Wirkung haben, während es die Protoxine des epsilon- und jota-Toxins zu fertigen Toxinen umwandelt. Die Verwendung von Trypsin zur Aktivierung des epsilon- und jota-Toxins hat für die Differenzierung der Typstämme B, D und E eine erhebliche Bedeutung erlangt.

2. Wachstumseigenschaften des Cl. welchii Typ A und Einfluß des Kulturverfahrens auf die alpha-Toxinproduktion

Zu den wichtigsten Faktoren, die die Produktion von alpha-Toxin des Cl. welchii beeinflussen, gehören die Zusammensetzung des Nährmediums, der pH-Wert, die Dauer der Bebrütung und die Bebrütungstemperatur.

Nach Gale und V. Heyningen (1942) wird das alpha-Toxin während der aktiven Wachstumsphase des Keimes gebildet und erreicht seine höchste Konzentration kurz nach Beginn der logarithmischen Wachstumsphase. Walbum und Reyman (1933) stellten fest, daß die Spitzenproduktion von alpha-Toxin binnen zehn Stunden erreicht ist, während das Toxin nach Logan et al. (1945) nach fünf- bis sechsstündiger Bebrütung vorliegt.

Es gibt viele Nährböden, die für die Produktion von Toxinen des Cl. welchii benutzt werden. Drei Bedingungen müssen jedoch zur Erzielung gut meßbarer Toxinmengen erfüllt sein:

1. Das Grundmedium muß aus Fleischbrühe bzw. Verdauungsprodukten von Fleisch bestehen. Walbum und Reyman (1933) benutzten eine Pepton-Kalbfleischbrühe. Dalling und Ross (1938) stellten zum ersten Mal fest, daß die Anzahl von Fleischstückchen ein besonders wichtiger Faktor für die Toxingewinnung ist. Die Autoren erreichten in ihrer Fleisch-infundierten Brühe eine Spitzenproduktion von alpha-Toxin, wenn die Basisbrühe 50% (des Volumens) gehackte Pferdemuskulatur enthielt. Später fanden Adams und Hendee (1945), daß enzymatische Fleischverdauungsprodukte für eine gute alpha-Toxinausbeute von grundlegender Bedeutung sind. Ein halbsynthetisches Pepton-Casein-Medium nach Taylor und Stewart (1941) befriedigte bei A-Stämmen nicht, da aus diesem Medium keine nachweisbaren Mengen der Lecithinase C entstanden.

2. Ein vergärbares Kohlenhydrat schien für die Ge-

winnung von alpha-Toxinen in einem Nährboden wesentlich zu sein. Doch stellten Walbum und Reyman (s.o.) fest, daß Glucose allein keinen erkennbaren Einfluß auf die Toxinproduktion ausübte. Gale und V. Heyningen (s.o.) hingegen erzielten etwa das Vierfache der alpha-Toxinmenge, wenn sie ihrem Nährmedium Glucose beifügten. Nach Nishida et al. (1961) eignen sich Stärke, Dextrin und Fructose als Zusätze, während Beer und Al-Khatib (1968) eine Fleischbouillon benutzten, der 1% Maltose zugefügt wurde. Logan et al. (1945) fanden heraus, daß Dextrin ein wesentlicher Faktor zur Erzielung von hohen Erträgen von alpha-Toxin war.

3. Der pH-Wert spielt eine wichtige Rolle für die Gewinnung von Lecithinase C. Nach Fuchs und Bondé (1957) lag das Produktionsoptimum in einem pH-Bereich von 6,7 bis 7,5. In der erwähnten Maltose-Fleischbouillon nach Nishida verringert sich die alpha-Toxinausbeute bei einem pH von über 7,0. Das Optimum liegt etwas unter pH 7,0 (pH 6,8). Pivnik et al. (1963) geben als optimalen pH-Wert 6,7 an. Gale und V. Heyningen wiesen 1942 nach, daß bei ihrem Pepton-Rindfleischextrakt-Nährboden der optimale pH-Wert zur Gewinnung von alpha-Toxin zwischem pH 5,5 und pH 7,0 liegt; die maximale Produktion erzielten sie bei pH 6,0. Wenn Glucose hinzugefügt wurde, werden maximale Toxinmengen zwischen pH 7,0 und pH 7,5 erzielt, wobei die Spitzenproduktion bei pH 7,0 liegt.

Auch die Bebrütungstemperatur scheint von Bedeutung zu sein: Fuchs und Bondé (s.o.) zeigten, daß das Wachstumsoptimum bei 37°C bis 44°C erwartet werden kann, während Batty (1970) eine Bebrütungstemperatur von 37,5°C für am günstigsten hielt.

3. Wirkungsmechanismus des alpha-Toxins

Kellaway und Trethewie (1941) stellten bei Laboratoriumstieren fest, daß das alpha-Toxin eine Kontraktion der glatten Muskulatur an den Bronchien, dem Darm und dem

Uterus bewirkt. Zamecnik, Nathanson und Aub (1947) injizierten das alpha-Toxin intravenös bei Hunden, und sie wiesen eine intravaskuläre Hämolyse, Ödeme und Hämorrhagien in den Lungen und im Dünndarm, sowie eine "Congestion" in Leber, Milz und Niere nach. Intramuskuläre oder subkutane Injektionen erzeugten keine Hämolysen, jedoch wurden in der Nähe der Injektionsstelle massiv verbreitete Ödeme beobachtet. Nach Zamecnik et al. (s.o.) wird das Fehlen einer intravaskulären Hämolyse nach der intramuskulären Applikation dadurch bedingt, daß das alpha-Toxin nicht in einer merkbaren Konzentration in den Kreislauf gelangen kann.

Die Entstehung von Hämorrhagien durch die Injektion von alpha-Toxin ist von fünf Faktoren abhängig; diese sind:

1. die Zerstörung der Erythrozyten
2. die Erhöhung der Prothrombinzeit
3. eine allgemeine Schädigung des Kapillarendothels
4. eine toxische Wirkung auf die Leber
5. die Freisetzung einer heparinartigen Substanz.

Daß die Leber tatsächlich nach Einspritzung von alpha-Toxin geschädigt wird, konnten Kellyway und Trethewie (s.o.) bestätigen.

Die intravaskuläre Hämolyse galt oft als primärer Grund für den Tod von Gasgangrän-Erkrankten, aber es entstanden Zweifel, ob die Hämolyse die führende Rolle bei den Todesursachen spielt, denn Frazer et al. (1945) konnten bei einer Gruppe schwer Erkrankter in keinem Fall intravaskuläre Hämolyse feststellen. Im Vordergrund standen stets ausgedehnte Ödeme, die durch die erhöhte Permeabilität der kleinen Blutgefäße bedingt waren. Nach Elder und Miles (1957) geht diese erhöhte Permeabilität auf die Wirkung des alpha-Toxins zurück. Die Autoren konnten darüber hinaus zeigen, daß Permeabilität und Letalität bei Mäusen parallel laufen,und begründeten damit, daß der auslösende Faktor für die Permeabilität das alpha-Toxin sein dürfte.

Die Verteilung und Bevorzugung bestimmter Organe bei Einwirkung des alpha-Toxins wies Ellner (1961) mit ^{14}C-markierten Toxinen nach. Er injizierte das radioaktiv präparierte Toxin intravenös bei Mäusen und Kaninchen und beobachtete das Verschwinden des Toxins aus dem Blutstrom, seine Anlagerung in Organen und sein Erscheinen in Urin und Atemluft. Am schnellsten nahm die Leber mit 72% das schnell aus dem Blutstrom verschwindende Toxin auf. Die Lungen waren mit 15%, die Nieren mit 8% und die Milz mit 5% an der Aufnahme beteiligt. In der Skelettmuskulatur und im Zentralnervensystem war kein Toxin nachweisbar. Dieser Befund wurde darauf zurückgeführt, daß das Toxin die Blut-Gehirn-Schranke nicht durchbrechen kann. In den Leberzellen wies Ellner (s.o.) das Toxin stark konzentriert in den Mitochondrien nach. Ähnliches nahmen schon Macfarlane und andere Autoren an.

Die wichtigste Organveränderung, die das alpha-Toxin bewirkt, ist die Myo-Nekrose. Nach Aikat und Dible (1956) kommt es zu einer direkten Einwirkung der Lecithinase C auf die Muskelfaser. Aus den am Muskelgewebe, das in vivo und in vitro alpha-Toxinen ausgesetzt wurde, histologisch festgestellten Veränderungen schlossen sie, daß das Toxin die Muskelmembranen schwächt, in dem es den Lipoprotein-Komplex oder direkt das Myosin verändert. Diese Veränderungen konnten durch spezifische Antikörper unterdrückt werden.

Der Mechanismus, der den Tod nach Wirkung des alpha-Toxins herbeiführt, ist noch nicht bis ins Letzte geklärt. Doch scheint aus den Arbeiten von Kielley und Meyerhoff (1948/50) sowie Macfarlane (s.o.) hervorzugehen, daß die Letalität - wie auch die Hämolyse - auf die Zerstörung des Lipoproteinkomplexes zurückzuführen ist. Eine durch Magnesium aktivierte Adenosintriphosphatase des Muskels, die mit einem Lipoproteid verbunden ist, konnte durch das alpha-Toxin inaktiviert werden. (Kielley und Meyerhoff). Macfarlane fand heraus,

daß eine Anzahl von Enzymen, die Lipoproteid-Charakter haben, durch das Toxin inaktiviert werden können.

4. Testungen des alpha-Toxins am Tier

Bull und Pritchett (1917) wiesen als erste nach, daß man bei der Kultivierung des Cl. welchii sehr wirksame, tödlich wirkende Filtrate herstellen konnte. Zunächst wurden Tauben und Kaninchen als Versuchstiere benutzt. Der Tod trat bei beiden Tierarten in kurzer Zeit ein, wenn große Mengen von Kulturfiltraten i.v. appliziert wurden. Wurden kleinere Mengen gespritzt, zeigte sich die letale Wirkung zwischen 6 und 24 Stunden. Bull und Pritchett (s.o.) benutzten Tauben auch zum Testen von Antiseren. Diese stellten sich die Autoren dadurch her, daß sie Kaninchen kleinere Mengen von Kulturfiltraten wiederholt injizierten. Etwa um die gleiche Zeit entwickelte Klose (1916) den Intracutantest beim Meerschweinchen. 1928 stellten Dalling, Glenny, Mason und Brien fest, daß bei einem Vergleich verschiedener Antiseren mit einem Standardserum im Hämolysetest und im Letalitätstest an Mäusen und Meerschweinchen sowie im Intracutantest am Meerschweinchen übereinstimmende Ergebnisse erzielt wurden.

Schlossberger und Menk (1929) empfahlen die Prüfung von Antiseren mit dem Neutralisationstest an Mäusen. Dabei wurden Gemische von Toxin und Antitoxin Mäusen i.v. injiziert. Beide Autoren bezeichnen das Verfahren als zuverlässig, billig und genau. Bengtson (1934) bestätigte dies und zeigte, daß der Mäuseneutralisationstest bei Verwendung von gleichen Toxinen in den verschiedenen Laboratorien zu gleichen Ergebnissen führte.

Tzeknovitzer und Karrouth (1930) prüften an Meerschweinchen im Intracutantest Verdünnungen von Kulturfiltraten, die in den einzelnen Stufen um 50% abnahmen, mit dem Ergebnis, daß die Typ-A-Filtrate stets übereinstimmende Ergebnisse aufwiesen. Auch Ssilanowa, die die

Intracutanprüfung an Kaninchen durchführte, berichtete über gute, gleichbleibende Ergebnisse. Wilsdon, der 1930 - 1933 als erster Autor eine Methode zur Differenzierung der verschiedenen Toxinarten des Cl. welchii entwickelte, bediente sich des Letalitätstestes an Mäusen, wobei er die Antiserum- und die Kulturfiltratgemische i.v. applizierte.

Glenny, Barr, Llewellyn-Jones, Dalling und Ross (1933) stellten fest, daß die Ergebnisse, die mit Typ-A-Filtraten im Hämolysetest, den Letalprüfungen an Mäusen und dem Intracutantest an Meerschweinchen erlangt wurden, sehr gut übereinstimmten. Nur selten betrug die Abweichung mehr als 20%.

Heute werden zur routinemäßigen Typisierung von Cl. welchii-Stämmen entweder der Mäuseletaltest oder der Intracutantest am Meerschweinchen empfohlen.

Beim Mäuseletaltest sind zwei Applikationsarten üblich: die intravenöse und die intraperitoneale Injektion. Smith und Holdeman (1968) benutzten beide Injektionsarten, während Beer und Al-Khatib (1968) sich für die intravenöse Injektion entschieden. Die Menge der zu injizierenden Flüssigkeit schwankt von 0,2 ml bis 0,5 ml. Smith und Holdeman (s.o.) empfehlen 0,4 ml. Die Wellcome - Laboratorien hingegen setzten die Impfdosis bei intravenöser Injektion der Maus auf 0,3 ml fest. Je nach Menge des im Filtrat enthaltenen Toxins zeigt die Maus nach der Impfung unterschiedliche Symptome. Bei hohen Giftmengen kann sie unmittelbar nach der Injektion unter Zuckungen verenden, bei geringerer Toxinmenge macht die Maus nach Spritzung einen kranken Eindruck. Das Fell wird struppig, und die Haut wird um die Mundpartie und die Füße dunkler. Nach dem Tode sind oft Erscheinungen einer Hämaturie nachweisbar. (Oakley; 1943)

Willis (1969), Batty (1970) und die Wellcome - Laboratorien (1970) schlagen für die Differenzierung eines Typenstammes des Cl. Welchii den Hautnekrosetest beim

Meerschweinchen vor. Dabei werden 0,2 ml eines Kulturfiltrates streng intracutan in die Meerschweinchenhaut gespritzt. Nach Oakley (s.o.) produziert alpha-Toxin in der Haut des Meerschweinchens eine gelblich-weiße Nekrose, der eine erhöhte Permeabilität der kleinen Blutgefäße in der Haut vorausgeht.

Oakley und Warrack empfahlen schon 1953 zur Routine-Typisierung des Cl. welchii den intradermalen Nekrosetest beim Meerschweinchen, den Hämolysetest mit Schaferythrozyten und den Lecitho-Vitellin-Test mit Eidotteremulsion.

5. Andere Nachweismethoden des alpha-Toxins

a) Hämolyse-Röhrchen-Test

Beim Hämolyse-Röhrchen-Test ist es üblich, rote Schafblutkörperchen nach der Methode von V. Heyningen (1941) zu benutzen. Oakley empfahl eine sechsprozentige Schaferythrozytensuspension, während Batty (1970) mit zehnprozentiger und Al-Khatib mit einprozentiger Suspension arbeiten.

Die Funktion des Hämolyse-Röhrchen-Testes ist an freie Calcium-Ionen gebunden (Oakley und Warrack; 1941).

Das alpha-Toxin ist ein "heiß - kalt" Hämolysin, so daß dann, wenn gut lysierbare Erythrozyten (rote Schafblutkörperchen) dem Toxin bei 37°C zugesetzt werden, in den hohen Toxinverdünnungen nicht sofort Hämolyse eintritt, sondern erst, wenn das Toxin-Erythrozyten-Gemisch unter eine kritische Temperatur abgekühlt (4°C - 8°C) wird. (V. Heyningen; 1941 / Macfarlane; 1950).

b) Hämolyse-Blättchen-Test

Hartwigk und Chenitir (1969) benutzten diesen Test als einfachen Nachweis für alpha-Toxine in Kulturfiltraten und Körperflüssigkeiten. Runde, mit Kulturfiltraten befeuchtete Fließpapier-Blättchen werden auf eine

Blut-Agarplatte gebracht. Nach etwa 16 Stunden kann man die hämolytischen Höfe ablesen, die sich nach Verbringen in den Kühlschrank durch das hot-cold Phänomen noch weiter aufhellen.

c) Lecitho-Vitellin-Test (LV-Test)

Unabhängig voneinander stellten Nagler (1939) und Seifert (1939) fest, daß Cl. welchii, wenn es mit Menschenserum zusammenkommt, eine Trübung auslöst, die als Opaleszenz bezeichnet wird. Später berichteten Macfarlane, Oakley und Anderson (1941), daß gefilterte Eidotteremulsionen eine ähnliche, jedoch stärkere Undurchsichtigkeit erzeugen (Lecitho-Vitellin-Reaktion). Die Opaleszenz war wie die Hämolyse von freien Ca-Ionen abhängig. Macfarlane et al. (s.o.) entwickelten den LV-Test bis zur praktischen Verwendbarkeit in der Diagnostik.

d) Lecitho-Vitellin-Blättchentest

Auf der Eigelb-Agarplatte nach Willis und Hobbs (1959) läßt sich die Lecithinase-Aktivität auch nachweisen. Die mit Kulturfiltraten befeuchteten Testblättchen werden auf die Eigelb-Agarplatte gebracht. Nach 24 Stunden kann man um die Blättchen einen opaleszierenden Hof sehen, dessen Breite Aufschluß über die Menge des alpha-Toxins gibt.

Das alpha-Toxin besitzt antigenen Charakter und ist nach Injektionen in ein lebendes Tier in der Lage, die Bildung von alpha-Antitoxinen zu induzieren. Ein Serum, das alpha-Antitoxin enthält, kann die Eigenschaften des alpha-Toxins neutralisieren (Oakley; 1943). Die Bestimmung einer unbekannten alpha-Toxinmenge ist dadurch möglich, daß man die Menge eines spezifischen Typ-A-Serums ermittelt, die das alpha-Toxin im Mäuseletal-, Hautnekrose-, Hämolyse- und Lecitho-Vitellin-Test neutralisiert. (Macfarlane et al.; s.o.). Die Anzahl der Antitoxin-Einheiten, die zur Neutralisation einer bestimmten

alpha-toxinhaltigen Filtratmenge gegen einen Indikator (Meerschweinchen, Maus, Erythrozyten oder Eidotteremulsion) benötigt werden, entspricht dem Bindungsvermögen dieser Filtratmenge.

III. Eigene Untersuchungen

1. Aufgabenstellung

Mit Hilfe biometrischer Berechnungen war zu untersuchen, welche der drei Methoden des Tierversuchs bei Verwendung gleicher Kulturfiltrate des Cl. welchii Typ A für die quantitative alpha-Toxinbestimmung zu den besten, insbesondere auch reproduzierbaren Ergebnissen führt. Es handelte sich einerseits um den Mäuseletaltest in seiner i.v.- und i.p.-Variante, andererseits um die intracutane Testung der Filtrate und Filtratverdünnungen am Meerschweinchen; und es sollte in diesen Fällen ermittelt werden, welche Art des Tierversuchs die geringste biologische Streuung aufweist. Bei Verwendung gleicher Filtratchargen war zu erwarten, daß die noch offene Frage, welche Art Tierexperiment sich für die quantitative alpha-Toxinbestimmung am besten eignet, beantwortet werden konnte.

Von dem für die Toxinfiltratherstellung verwendeten A-Stamm wurde zwar angenommen, daß er neben alpha-Toxin auch noch theta-Toxin produzieren würde, doch das theta-Toxin blieb bei meinen Untersuchungen unberücksichtigt, weil die Kulturfiltratgewinnung unter aeroben Bedingungen, unter Verwendung von Herzmuskelstücken im Nährboden und mit Filtration durch ein Tiefenfilter (Seitz EK-Filter Scheibe Gr. 3) erfolgte.

In einer besonderen Versuchsreihe wurden noch Kulturfiltrate mit einem zweiten Nährmedium hergestellt und in gleicher Weise wie die mit dem ersten Nährboden gewonnenen Kulturfiltrate auf ihren alpha-Toxingehalt geprüft. Durch die Verwendung von zwei verschiedenen Nährmedien sollte sichergestellt werden, daß die bei den verschiedenen Versuchstieren induzierten Reaktionen im wesentlichen durch das alpha-Toxin und nicht durch Bestandteile der Nährböden oder ihrer Abbauprodukte hervorgerufen worden waren.

2. Material und Methoden

Ich verwendete den im Institut als A_1 bezeichneten Stamm CN 3920, der im September 1967 als lyophilisierte Kultur in Vakuumampullen von Burroughs Wellcome & Co aus London gekommen war und seitdem von den Mitarbeitern des Institutes laufend auf frische Nährböden (Leber-Leber-Bouillon oder Traubenzucker-Blut-Agarplatten) überimpft worden war. Eine Leber-Leber-Bouillon-Kultur (LLB), die unter Paraffinverschluß aufbewahrt worden war, wurde auf mehrere Traubenzucker-Blut-Agarplatten überimpft und auf Reinheit geprüft. Dann wurde eine einzelne, mittelgroße Kolonie auf eine LLB überimpft und die Passagierung über LLB noch zwei- bis dreimal wiederholt, um die letzte LLB-Kultur als Einsaat für ein Nährmedium zu verwenden.

Die auf Traubenzucker-Blut-Agarplatten sowie auf LLB verimpften Kolonien wurden stets nur 24 Stunden bei 37°C bebrütet.

Ich benutzte zunächst das für die Toxingewinnung im Institut gebräuchliche Logan-Substrat, dessen Zusammensetzung von Logan et al., F. Franke und v. Schmude angegeben worden ist. Es handelt sich um eine Caseinhydrolysat-Dextrin-Bouillon mit Herzfleischmuskelstückchen (CDB), die in Mengen von 50 ml in Erlenmeyerkolben vorrätig gehalten wurde. Kurz vor der Beimpfung wurden die Kolben zehn Minuten lang gekocht, um den Sauerstoff auszutreiben, und anschließend unter fließendem Wasser abgekühlt. Dann erfolgte ein Zusatz von 2,5 ml einer 25%igen Dextrinsuspension. Als Einsaat wurde stets 0,5 ml LLB-Kultur je 50 ml-Kolben benutzt. Nach fünfstündiger Inkubation im evakuierten Exsikkatortopf bei 37°C wurde die Kultur zur Vorklärung bei 5000 U/min 30 Minuten lang zentrifugiert. Danach wurde sie durch ein Seitz EK-Filter Gr. 3 keimfrei filtriert. Das auf diese Weise gewonnene Toxinfiltrat wurde während der Testungen bei +5°C im Kühlschrank aufbewahrt. Nach

abgeschlossener Testung erfolgte eine Lagerung bei $-18^{o}C$, die nach den Erfahrungen des Institutes über Monate keinen Toxinverlust bedingt.

Als weitere Nährmedien wurden in die alpha-Toxin-Gewinnungsversuche einbezogen:

1. Ein Fertignährboden von Oxoid, der als Nährmedium nach Robertson bezeichnet wird

und 2. das Miller und Mueller - Substrat, das sich bei der Tetanustoxingewinnung (Holland; 1971) bewährt hat.

Nach zehnmaliger Adaption des A_1-Stammes an beide Nährmedien ließen sich bei der Injektion ihrer Kulturfiltrate weder Letalität bei Mäusen noch Nekrosereaktionen bei Meerschweinchen nachweisen, obwohl ein Wachstum auf beiden Nährböden eingetreten war. Beide Nährmedien schieden daher für weitere Versuche aus.

Als drittes Nährmedium wurde das Oxoid-Robertson-Medium in modifizierter Form in meine Versuche einbezogen.

Die Modifizierung bestand darin, daß ich dem Oxoid-Fertignährboden - parallel dem Verfahren mit der CDB nach Logan - nach zehnminütigem Kochen und anschließender Abkühlung unter fließendem Wasser 2,5 ml einer 25%igem Dextrinsuspension pro 50 ml Substrat zusetzte.

3. Tierversuche

1. Mäuse

Als Versuchsmäuse wurden Albino-Mäuse des Stammes NMRI aus eigener Nachzucht verwendet, die konventionell aufgezogen und gehalten wurden. Das Gewicht der Mäuse lag zwischen 18 und 22 g je Tier. Nur gesunde Tiere beiderlei Geschlechts wurden für die Versuche gebraucht.

Die i.v.-Injektion wurde in die Schwanzvene durchgeführt.

Bei der i.p.-Injektion wurden die Mäuse im Nacken ge-

halten, umgedreht und dann in der Leistengegend intraperitoneal gespritzt.

0,4 ml der Filtrate oder Filtratverdünnungen wurden stets je Maus mit einer Tuberkulinspritze mit feiner Nadel Cro-Ni 0,25 x 19 mm i.v. oder i.p. injiziert.

Die Mäuse wurden durch Farbstiftzeichen randomisiert und nach der Einspritzung in Makrolonkäfige gesetzt. Die Kontrolle der einzelnen Gruppen erfolgte bis 24 oder 48 Stunden p.i.. Für jede Verdünnungsstufe wurden stets 20 Mäuse verwendet.

2. Meerschweinchen

Für den Intracutantest verwendete ich 400 g bis 600 g schwere, gesunde Albinomeerschweinchen beiderlei Geschlechts, die im Institut konventionell gezüchtet und gehalten wurden.

Einen Tag vor der Testung wurden den Tieren beiderseits am Rücken, vom Nacken bis zum Schwanzansatz, zunächst die Haare geschoren,und dann eine handelsübliche Enthaarungscreme aufgetragen. Mit dem Spatel wurde die Depilation vorgenommen und hinterher die Haut mit warmen Wasser abgewaschen und mit einem Tuch abgetrocknet. Nach dieser Prozedur wurden die Tiere in einem geheizten Raum untergebracht.

Für die intracutane Injektion diente die Tuberkulinspritze. Die Dosis betrug stets 0,2 ml je Injektion. An der Injektionsstelle bildete sich nach der streng intracutanen Einspritzung eine etwa linsengroße, helle Quaddel, die nach etwa 30 Minuten wieder verschwand. Da ein Mindestabsta nd von etwa 1 cm zwischen zwei Injektionsstellen erforderlich war, konnten an jedem einzelnen Tier, je nach Größe, 14 bis höchstens 20 Injektionen durchgeführt werden.

Nach 48 Stunden traten die Nekrosen als weißlich-gelbe Verfärbungen mit rotem Hof hervor, jedoch wurden

auch noch stecknadelkopfgroße Nekrosen als positiv bewertet.

Um eine Hilfsperson beim Halten der Tiere entbehrlich zu machen, versuchte ich, die Meerschweinchen mit 0,5 ml oder 0,6 ml pro 100 g KGW einer 10%igen Nembutal-Lösung i.p. zu betäuben. Die nach 15 bis 20 Minuten eintretende Narkose ermöglichte zwar die intracutane Einspritzung ohne Hilfsperson, aber es ließen sich - namentlich bei jüngeren Tieren - Verluste durch Überdosierung nicht vermeiden. Deshalb wurde die Narkose wieder aufgegeben.

Vor Beginn der Tierversuche wurden die Kulturfiltrate zur Kontrolle dem Hämolyse-Röhrchen- und dem Lecitho-Vitellin-Test unterworfen. Diese Teste wurden in der von F. Franke (1968) und v. Schmude (1971) angegebenen Weise durchgeführt.

Ergebnisse:

1. Bio-mathematische Erläuterungen

Zur Klärung der Frage, welche der drei Versuchsarten die optimalen Ergebnisse erbrachte, bot sich die Aufstellung einer Dosis-Wirkungs-Kurve an. Aus dieser ist mit relativ geringem Aufwand graphisch zu ersehen, welche Methode aufgrund ihrer Steigung die stärkste biologische Varianz aufweist und welches Testtier am empfindlichsten reagiert.

Die Dosis-Wirkungs-Kurve ist die geometrische Darstellung der gemessenen Reaktion, deren Abszisse die Dosis und deren Ordinate die Reaktion mißt.

Bei Reaktionen, durch die die Häufigkeiten der Tiere gemessen werden, die auf die verschiedenen Dosen eines Pharmakons spezifisch reagieren, ergeben sich oft flache, S-förmige Kurven. Die Transformation der Ordinate zwecks Begradigung der Dosis-Wirkungs-Kurve wird zumeist über die sogenannte "Probit-Transformation" vorgenommen.

Der einfachste Schritt zur Bemessung der Dlm_{50} bzw. Dnm_{50} einer Dosis-Wirkungs-Kurve ist die Auswertung mit Hilfe eines Wahrscheinlichkeitspapiers. Das beruht auf einer Transformation der Ordinatenskala nach dem Gauß'schen Integral. Dadurch wird auch die Kurve selbst transformiert; insbesondere werden Summenkurven von Normalverteilungen zu Geraden gestreckt. Auf diese Weise kann man schon mit bloßem Auge erkennen, ob eine normale Verteilung der aufgetretenen Häufigkeiten einer Reaktion vorliegt. In diesem Fall nämlich liegen die gefundenen Werte annähernd auf einer Geraden. Die Normalverteilung ist eine wesentliche Voraussetzung zur Bemessung oder Berechnung der Dlm_{50} bzw. Dnm_{50} und ihrer Grenzen bei der Benutzung dieser Methode. Wenn die Verteilung nicht symmetrisch ist, so kann man mit Hilfe von Logarithmen anstelle der numerischen Dosen auf der

Abszisse oftmals eine Symmetrie erreichen, und dann auf dem Wahrscheinlichkeitsnetz mit logarithmischer Abszisse eine Gerade erkennen.

Die Ermittlung der 50%ig wirksamen Dosis ist im Wahrscheinlichkeitspapier recht einfach. Es genügt, auf der Abszisse diejenige Dosis abzulesen, über welcher die die Beobachtungspunkte ausgleichende Gerade den Wert 50 annimmt.

Da zwischen Mittelwert einer Normalverteilung und der sich durch Hinzufügung der einfachen (positiven) Standardabweichung ergebenden Abszisse etwa 34% der Beobachtungen liegen, braucht man nur diejenige Abszisse aufzusuchen, auf welcher die ausgeglichene Gerade im Wahrscheinlichkeitsnetz den Wert von 84% (50% + 34%) annimmt. Der Abstand vom 50%-Wert bis zum 84%-Wert auf der Abszisse ist die Standardabweichung.

Hier wurden Wahrscheinlichkeitsnetze der Firma Schleicher & Schüll, Einbeck/Hann. Nr. 297 1/2 A_3 (log. Abszisse) verwandt.

Außerdem machte ich noch eine Schätzung der mittleren tödlichen Dosis nach der Methode von Spearman-Kärber. Dieser Methode liegt eine Schätzung des arithmetischen Mittels einer Häufigkeitsverteilung zugrunde und die geht nach der Formel:

$$Dlm_{50} = X_k + \frac{1}{2} \cdot d - d \cdot \frac{SP_i}{100}$$

wobei X_k der Logarithmus der kleinsten Dosis, von welcher ab noch stets 100%ige Reaktionen beobachtet werden,

d der Logarithmus des Verhältnisses zweier aufeinander folgender Dosen,

P_i die Häufigkeit der Reaktionen bei der i-ten Dosis und

S das Summenzeichen;
also $SP_i = P_0(0\%) + P_1 + \ldots P_k\ (100\%)$

ist.

Der Standardfehler wird näherungsweise mit der Formel

$$m_s = \pm \frac{d}{100} \cdot S \frac{P_i \cdot (100 - P_i)}{n_i - 1} ,$$

wobei n_i die Anzahl der getesteten Reagenten ist, ermittelt. Aus dem Standardfehler lassen sich nun 95%ige Vertrauensbereichsgrenzen nach der Formel

$$m = \pm 2 \cdot m_s$$

angeben.

Bei der Aufstellung der Dosis-Wirkungs-Kurve wurden je Dosis 20 Tiere bzw. Injektionsstellen gebraucht. Die Dosisverdünnung betrug, von 0,2 ml beginnend, jeweils 2/3 der vorangegangenen Dosis (0,2 · 2/3 · 2/3 ... usw.). Dadurch konnten die Bereiche von 0% - 100% Reaktion so gewählt werden, daß eine echte Dosis-Wirkungs-Kurve entstand.

2. Darstellung der Ergebnisse in Tabellen und Abbildungen

Zuerst wurden je zwei Hämolyse-Röhrchen- und Lecitho-Vitellin-Teste mit allen drei Chargen durchgeführt. Es ergab sich, daß die Toxinaktivität der Charge 3 (Oxoid-Nährboden nach Robertson, modifiziert) bei der Hämolyse zwei bis drei Stufen und bei der LV-Reaktion ein bis zwei Stufen unter der Aktivität der Chargen 1 und 2 (CDB nach Logan) lag.

24- oder 48stündige Beobachtungsdauer des Mäuseletaltestes mit Charge 1

Das erste Kulturfiltrat ergab bei der Vortestung mit dem Hämolyse-Blättchentest eine ausreichende Aktivität. (Durchmesser des hämolytischen Hofes: 6 mm)

Es schloß sich ein Mäusevorversuch an, um den Bereich abzugrenzen, der die gesamte Wirkungsbreite von 0% bis 100% zeigt. Je zwei Mäusen wurde intravenös oder intraperitoneal injiziert. Die Ausgangsdosis betrug 0,2 ml, jede weitere wurde mit 1/2 multipliziert. Ergebnisse siehe Tabelle 1.

Tabelle 1: Mäusevorversuch

	0,2		0,1		0,05		0,025		0,0125		0,0064	
	iv	ip	iv	ip	iv	ip	iv	ip	iv	ip	iv	ip
+	2	2	2	2	2	2	2	1	0	0	0	0
-	0	0	0	0	0	0	0	1	2	2	2	2

Erklärungen: iv = intravenöse Injektion
ip = intraperitoneale Injektion
\+ = tote Mäuse
\- = überlebende Mäuse

Der Wirkungsbereich (0% - 100%) liegt also zwischen etwa 0,05 und 0,0064 ml.

Mit kleineren Abstufungen (0,2 x 2/3 = 0,13; 0,13 x 2/3 = 0,088; 0,088 x 2/3 usw.) wurde die Dosis-Wirkungs-Kurve

ermittelt. Dieser Versuch sollte zeigen, ob sich wesentliche Unterschiede ergeben, wenn das Ergebnis entweder nach 24 Stunden oder nach 48 Stunden Einwirkungszeit des toxinhaltigen Kulturfiltrates auf Mäuse abgelesen wird.

Tabelle 2: Mäusehauptversuch (abs. Zahlwerte)

a) intravenöse Injektion;nach 24 Stunden

	0,089	0,059	0,039	0,026	0,018	0,012	0,0078
+	20	20	18	12	12	3	0
-	0	0	2	8	8	17	20

b) intravenöse Injektion;nach 48 Stunden

+	20	20	18	12	10	4	0
-	0	0	2	8	10	16	20

c) intraperitoneale Injektion;nach 24 Stunden

	0,089	0,059	0,039	0,026	0,018	0,012	0,0078
+	20	18	14	8	2	0	0
-	0	2	6	12	18	20	20

d) intraperitoneale Injektion;nach 48 Stunden

+	20	18	14	5	0	0	0
-	0	2	6	15	20	20	20

Eingesetzt wurden 20 Mäuse pro Dosis, so daß sich, ausgedrückt in % der gestorbenen Mäuse, folgendes ergibt:

Tabelle 3: Mäusehauptversuch (rel.Zahlwerte)

a) intravenöse Injektion

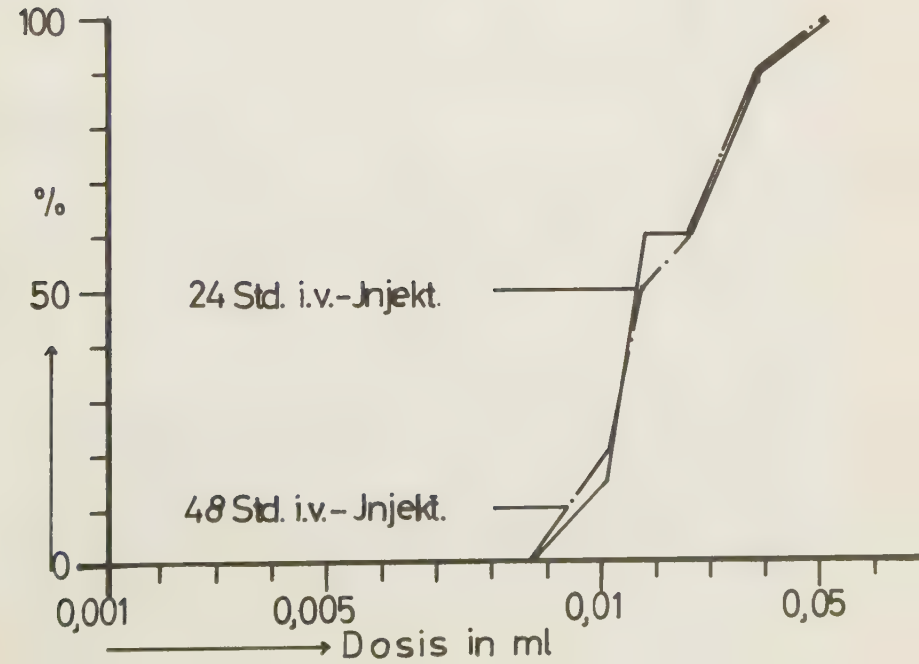
	0,089	0,059	0,039	0,026	0,018	0,012	0,0078
24 Std.	100	100	90	60	60	15	0
48 Std.	100	100	90	60	50	20	0

b) intraperitoneale Injektion

24 Std.	100	90	70	40	10	0	0
48 Std.	100	90	70	25	0	0	0

Vorstehende Zahlenwerte wurden in Kurvenbildern (Abb. 1 - 3) dargestellt. Kurve 1, Seite 29, zeigt die Häufigkeitsverteilung bei intravenöser Injektion bei einer Beobachtungsdauer von 24 Std. und 48 Std..

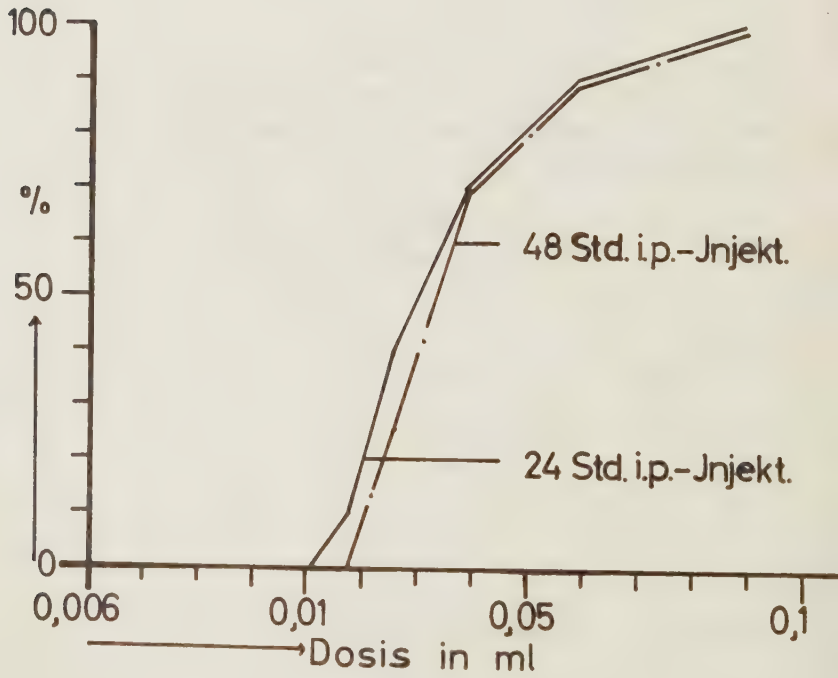
Abb. 1: Dosis-Wirkungs-Kurve (DWK) nach i.v. Injektion; Ablesung nach 24 oder 48 Std.



Kurve 2, Seite 30, zeigt die Häufigkeitsverteilung bei intraperitonealer Injektion bei einer Beobachtungsdauer von 24 Std. und 48 Std..

Kurve 3, Seite 31, zeigt den Vergleich zwischen intravenöser und intraperitonealer Injektion bei 24 Stunden Beobachtungsdauer.

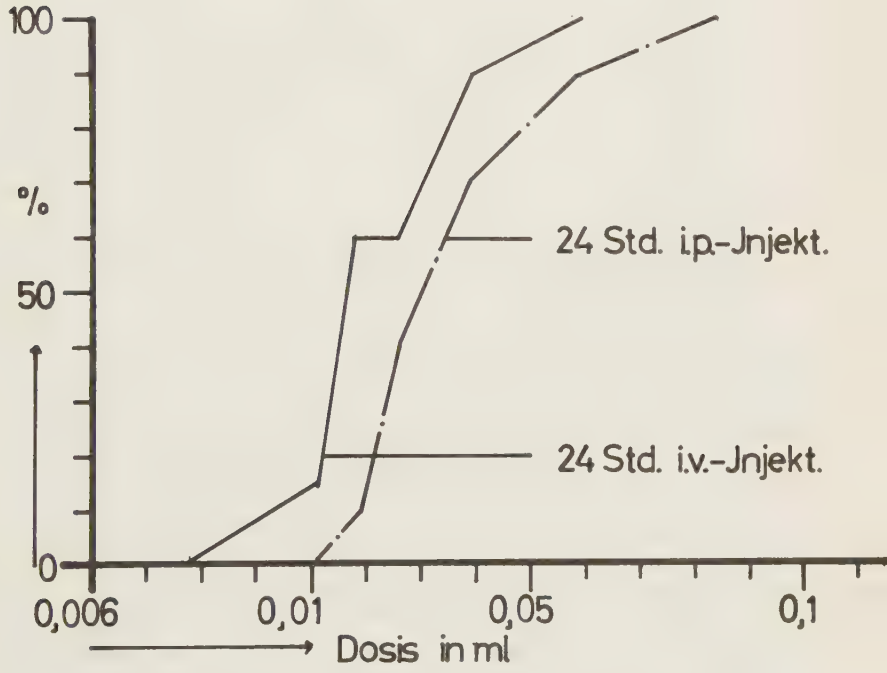
Abb. 2: DWK nach i.p.-Injektion; Ablesung nach 24 oder 48 Std.



Aus Abb. 1 ergibt sich eine geringfügige Begradigung des 24stündigen Kurvenverlaufes durch die 48-Stunden-Kurve bei der intravenösen Injektion. Einen ähnlichen Verlauf zeigt die Kurve bei der intraperitonealen Injektion (Abb. 2); das gab mir Anlaß, die weiteren

Versuchsergebnisse nur noch nach 24 Stunden Einwirkungszeit abzulesen im Hinblick darauf, daß der zeitliche Aufwand geringer war und die Ergebnisse bei 24- oder 48stündiger Ablesung sich nahezu deckten.

Abb. 3: DWK-Vergleich i.v.- und i.p.-Injektion; Ablesung nach 24 Std.



Aus Abb. 3 ist ein deutlicher Unterschied zwischen der Wirkung der intravenösen und der intraperitonealen Injektion bei Mäusen der Charge 1 nach 24 Stunden Einwirkungsdauer erkennbar. Dieser Unterschied besteht darin, daß die Maus zwar eine größere Empfindlichkeit nach der i.v.-Injektion gegenüber den Toxinen des Kulturfiltrates aufzeigt, aber eine größere biologische Varianz im Vergleich zur i.p.-Injektion zeigt.

Vergleich des i.v.- und des i.p.-Testes an der Maus mit dem Intracutantest am Meerschweinchen

Das zweite Kulturfiltrat (Charge 2) war eine fünf Stunden lang bebrütete CDB nach Logan. Das Filtrat zeigte beim Blättchentest einen hämolytischen Hof von 7 mm.

Der Wirkungsbereich von Charge 2 ist aus Tabelle 4 ersichtlich.

Tabelle 4: Mäusevorversuch

	0,2		0,1		0,05		0,025		0,0125		0,0064	
	iv	ip	iv	ip	iv	ip	iv	ip	iv	ip	iv	ip
+	2	2	2	2	2	2	2	1	0	0	0	0
-	0	0	0	0	0	0	0	1	2	2	2	2

Der Wirkungsbereich liegt demnach zwischen 0,05 und 0,0064 ml.

Tabelle 5: Mäusehauptversuch (rel. Zahlwerte)

a) intraperitoneale Injektion

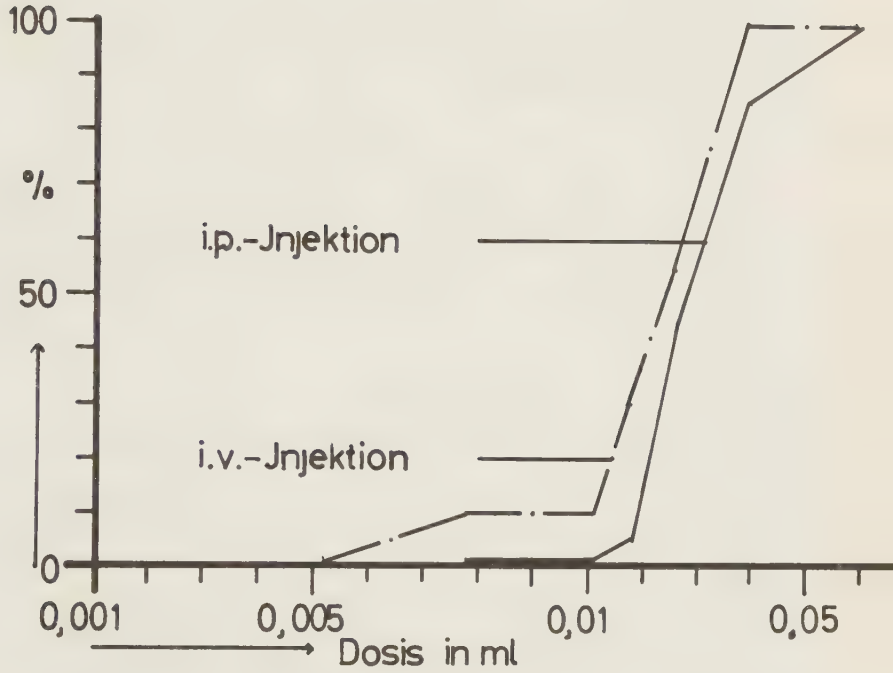
0,0052	0,0078	0,012	0,018	0,026	0,039	0,059
0	0	0	5	45	85	100

b) intravenöse Injektion

0	10	10	30	55	100	100

Tabelle 5 zeigt die in % ausgedrückte Rate der gestorbenen Mäuse. In der dazugehörenden Abb. 4 zeichnet sich wieder die größere Empfindlichkeit sowie die größere biologische Streuung der intravenösen Injektion gegenüber der intraperitonealen Injektion ab.

Abb. 4: DWK-Vergleich i.v.- und i.p.-Injektion bei Mäusen mit Charge 2



Da zwischen der Testung bei Mäusen und der Testung bei Meerschweinchen etwa zehn Tage lagen, wurde das Filtrat vorher noch einmal i.v. an Mäuse gespritzt, um dadurch sicherzustellen, daß beim Toxinfiltrat kein Toxinverlust eingetreten war. Das Ergebnis zeigt, daß die letale Dosis des Toxins etwa konstant geblieben ist.

Tabelle 6: Kontrolltestung der Charge 2 im i.v.-Mäuseletaltest

	0,2	0,1	0,05	0,025	0,0125	0,0064
+	2	2	2	2	0	0
-	0	0	0	0	2	2

Zur Darstellung der Dosis-Wirkungskurve der Intracutaninjektionen am Meerschweinchen war es nötig, das Kulturfiltrat der Charge 2 zum Erkennen der Wirkungsbreite auch in der Meerschweinchenhaut vorzutesten. Ausnahmsweise wurden 22 Injektionen an einem Meerschweinchen durchgeführt.

Tabelle 7: Meerschweinchenvorversuch

0,13	0,089	0,059	0,039	0,026	0,018	0,012	0,0078	0,0052	0,0035	0,0023
+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-
+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-

Erklärungen: + = Nekrose
- = ohne Nekrose

Der Bereich lag also zwischen 0,026 und 0,0023 ml.

Um zu mit dem Mäusetest vergleichbaren Ergebnissen zu kommen, mußten 20 Ergebnisse der intracutanen Injektion pro Dosis vorliegen. Von insgesamt 15 in die Versuche einbezogenen Meerschweinchen erwiesen sich nur zehn Tiere für den intracutanen Test geeignet. Fünf Meerschweinchen reagierten auch gegenüber der größten Toxindosis negativ. Die Ablesung der Hautreaktionen erfolgte stets nach 48stündiger Einwirkungsdauer, weil nach 24 Stunden oftmals keine Veränderungen der Haut beobachtet werden konnten.

Tabelle 8: Meerschweinchen-Hauptversuch

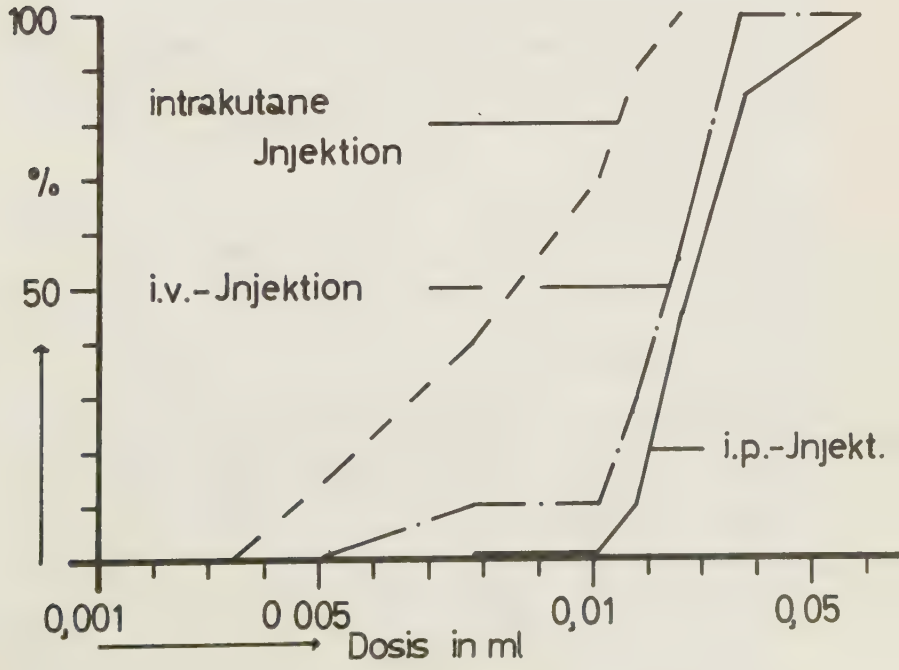
	0,026	0,018	0,012	0,0078	0,0052	0,0035	0,0023
+	20	18	14	8	3	0	0
-	0	2	6	12	17	20	20
in %	100	90	70	40	15	0	0

Tabelle 8 zeigt das Verhältnis zwischen positiver und negativer Reaktion pro Dosis, sowie die in % ausgedrückte Rate der Nekrose-Reaktion.

Das Kurvenbild wird in Abb. 5 (s. Seite 35) dargestellt; wobei gleichzeitig der Mäuseletaltest in den beiden Injektionsvarianten durch Kurven mit dem Meerschweinchen-Intrakutantest verglichen wird.

Wie zu erwarten war, ergibt sich, daß die Intracutan-Methode die empfindlichste ist. Ihr folgt die intravenöse Methode. Die intraperitoneale Methode leistet hinsichtlich der Empfindlichkeit am wenigsten. Dagegen scheint die biologische Streuung bei der intravenösen Injektion am größten zu sein.

Abb. 5: DWK-Vergleich der i.v.- und i.p.-Injektionen bei Mäusen und intracutane Injektionen beim Meerschweinchen



Zur Ermittlung der Dlm_{50} bzw. Dnm_{50} wurden die Kurven der Abb. 5 auf ein Wahrscheinlichkeitsnetz übertragen (Abb. 6, Seite 37) und direkt abgelesen.

Es ergeben sich folgende Werte:

intravenöse Injektion (Maus)	:	0,019 ml
intraperitoneale Injektion (Maus)	:	0,026 ml
intracutane Injektion (Meerschweinchen)	:	0,0088ml

Da diese Ablesungen nur sinnvoll sind, wenn die Beobachtungen einer Normalverteilung unterliegen, ist die Ablesung bei der Kurve der intravenösen Injektion nur mit Einschränkungen zu bewerten. Bei den Beobachtungen der i.v.-Injektion handelt es sich um eine binomiale Verteilung, die auf ein zu heterogenes Testmaterial schließen läßt.

Bei der Schätzung der Dlm_{50} nach der Methode von Spearman-Kärber müssen hinsichtlich der Ergebnisse bei der Testreihe nach i.v.-Injektionen die gleichen Bedenken und Einschränkungen geltend gemacht werden.

Durch die Schätzung habe ich folgende Werte ermittelt:

intravenöse Injektion (Maus) :

$$m = -1{,}4033 + \frac{1}{2} \times 0{,}1761 - 0{,}1761 \frac{245}{100}$$

$$Dlm_{50} = \underline{0{,}021 \text{ ml}}$$

intraperitoneale Injektion (Maus) :

$$m = -1{,}4033 + \frac{1}{2} \times 0{,}1761 - 0{,}1761 \frac{205}{100}$$

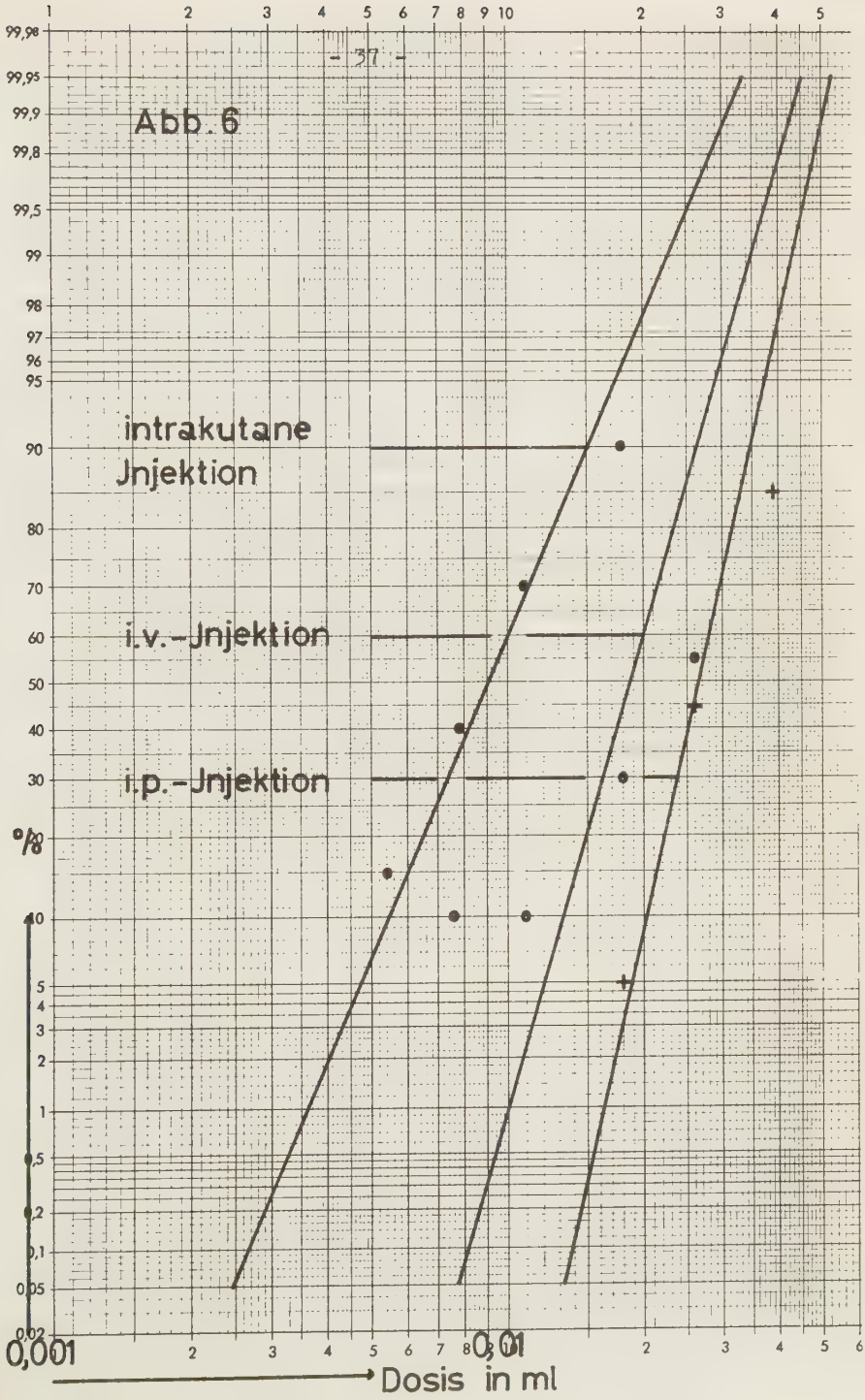
$$Dlm_{50} = \underline{0{,}027 \text{ ml}}$$

intracutane Injektion (Meerschweinchen) :

$$m = -1{,}5794 + \frac{1}{2} \times 0{,}1761 - 0{,}1761 \frac{315}{100}$$

$$Dnm_{50} = \underline{0{,}009 \text{ ml}}$$

Abb. 6


intrakutane Jnjektion
i.v.-Jnjektion
i.p.-Jnjektion
%
Dosis in ml
0,001
0,01

Der Vertrauensbereich, der sich aus dem Standardfehler ergibt, liegt bei der

intravenösen Injektion zwischen
0,02445 ml und 0,01815 ml ,
intraperitonealen Injektion zwischen
0,02996 ml und 0,02413 ml und
intracutanen Injektion zwischen
0,01263 ml und 0,00781 ml.

Beim Vergleich der graphischen Methode im Wahrscheinlichkeitspapier zur Ermittlung der Dlm_{50} bzw. Dnm_{50} mit der Schätzung nach Spearman-Kärber fällt auf, daß die im Wahrscheinlichkeitsnetz gefundenen Werte der Dlm_{50} bzw. Dnm_{50} immer in dem nach der Methode von Spearman-Kärber geschätzten Vertrauensbereich liegen.

Für eine einfache Ermittlung der Dlm_{50} bzw. Dnm_{50} scheint es also auszureichen, eine Dosis-Wirkungs-Kurve aufzustellen, sie im Wahrscheinlichkeitsnetz zu begradigen und den Wert der mittleren tödlichen Dosis direkt abzulesen. Diese Methode läßt sich - wie angedeutet - jedoch nur bei einem möglichst homogenem Versuchsmaterial durchführen, weil nur bei diesem die Verteilung der Beobachtungen normal wird.

Vergleich des i.v.- und i.p.-Testes an der Maus mit dem Intracutantest am Meerschweinchen unter Benutzung des modifizierten Oxoid-Nährmediums nach Robertson

Um die Ergebnisse der vorherigen Versuchsreihe zu überprüfen, wurden die Versuche bei gleicher Versuchsanordnung mit einem durch Dextrinzusatz modifizierten Nährboden (Oxoid) nach Robertson = Charge 3 wiederholt, wobei gleichzeitig ein neues und einfach herzustellendes Nährmedium getestet werden konnte.

Die Vortestung des Filtrates mit dem Hämolyse-Blättchen-Test zeigte eine gute, hämolytische Aktivität. (Durchmesser des hämolytischen Hofes betrug 6 mm)

Nach Tabelle 9 lag der Wirkungsbereich dieser Charge bei Mäusen zwischen 0,05 und 0,0064.

Tabelle 9: Mäusevorversuch

	0,2		0,1		0,05		0,025		0,0125		0,0064	
	iv	ip	iv	ip	iv	ip	iv	ip	iv	ip	iv	ip
+	2	2	2	2	2	2	2	0	1	0	0	0
-	0	0	0	0	0	0	0	2	1	2	2	2

Nach diesem Ergebnis schien das modifizierte Oxoid-Robertson-Medium mehr Toxin zu produzieren als die CDB nach Logan.

Es schloß sich der Hauptversuch an:

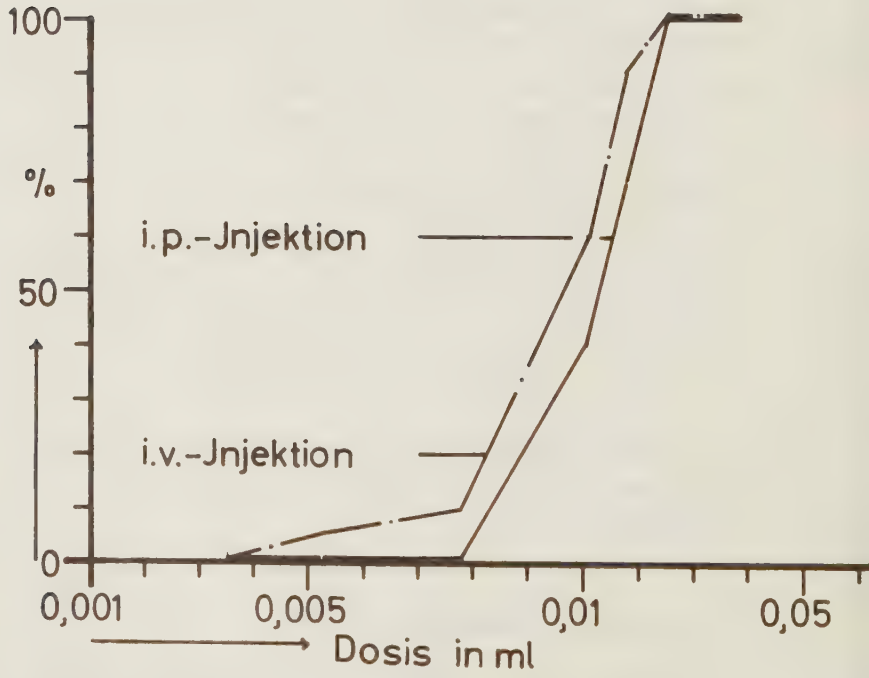
Tabelle 10: Mäusehauptversuch

	0,039		0,026		0,018		0,012		0,0078		0,0059		0,0035	
	iv	ip	iv	ip	iv	ip	iv	ip	iv	ip	iv	ip	iv	ip
+	20	20	20	20	18	14	12	8	2	0	1	0	0	0
-	0	0	0	0	2	6	8	12	18	20	19	20	20	20
in %	100	100	100	100	90	70	60	40	10	0	5	0	0	0

Tabelle 10 zeigt bei 20 eingesetzten Mäusen das Verhältnis der überlebenden und toten Mäuse, sowie die in % ausgedrückte Rate der gestorbenen Mäuse.

Die Abb. 7 (s. Seite 40) entspricht im wesentlichen der Abb. 4 (s. Seite 33). Doch ist deutlich zu sehen, daß die Letalität der Charge 3 stärker ist als die der Chargen 1 und 2.

Abb. 7: DWK-Vergleich i.v.- und i.p.-Injektion bei Mäusen mit Charge 3



Bei der Testung der Intracutan-Methode wurden 13 Meerschweinchen eingesetzt, von denen - ähnlich der vorherigen Versuchsreihe - drei Tiere keine Reaktion zeigten. So konnten 20 Reaktionen pro Dosis ausgewertet werden.

Nach Tabelle 11 lag der Wirkungsbereich von 0% bis 100% zwischen 0,0078 und 0,00069.

Tabelle 11: Meerschweinchen-Vorversuch

0,039	0,026	0,018	0,012	0,0078	0,0052	0,0035	0,0023	0,0015	0,0010	0,00069
+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-

Tabelle 12 zeigt das Verhältnis positiver zu negativer Reaktion sowie die in % ausgedrückte Rate der positiven Reaktionen als Teilgrundlage zu Abb. 8 (s. Seite 42).

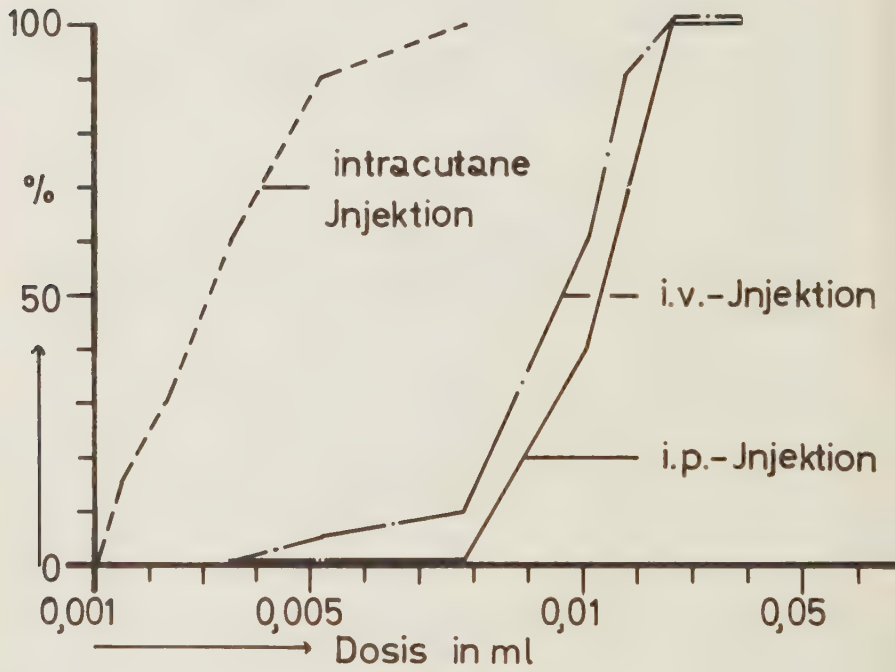
Tabelle 12: Meerschweinchen-Hauptversuch

	0,0078	0,0052	0,0035	0,0023	0,0015	0,001o	0,00069
+	20	18	12	6	3	0	0
-	0	2	8	14	17	20	20
in %	100	90	60	30	15	0	0

Aus dem direkten Vergleich der Wirkungen der Charge 3 (Abb. 8, s. Seite 42) in den drei Tierversuchen geht hervor, daß der intracutane Test am Meerschweinchen am empfindlichsten ist. Ihm folgen hinsichtlich der Empfindlichkeit zunächst der i.v.- und dann der i.p. Mäuseletaltest. Die Streuung scheint bei dem i.v.-Test an der Maus am größten zu sein.

Zur Ermittlung der Dlm_{50} bzw. Dnm_{50} wurde wieder im Wahrscheinlichkeitsnetz direkt abgelesen und eine Schätzung nach der Methode von Spearman-Kärber vorgenommen. Die Kurven der Abb. 8 wurden in ein Wahrscheinlichkeitspapier übertragen (s. Abb. 9, Seite 43).

Abb. 8: DWK-Vergleich i.v.- und i.p.-Injektion bei Mäusen und intracutaner Injektion beim Meerschweinchen



Folgende Werte waren im Wahrscheinlichkeitspapier abzulesen:

intravenöse Injektion (Maus)	:	0,010 ml
intraperitoneale Injektion (Maus)	:	0,014 ml
intracutane Injektion (Meerschweinchen)	:	0,003 ml

Ähnlich wie im Versuch mit Charge 2 liegt bei der i.v.-Injektion (Abb. 9) keine Normalverteilung vor.

Bei der Schätzung der mittleren tödlichen Dosis nach der Methode von Spearman-Kärber ergeben sich folgende Werte:

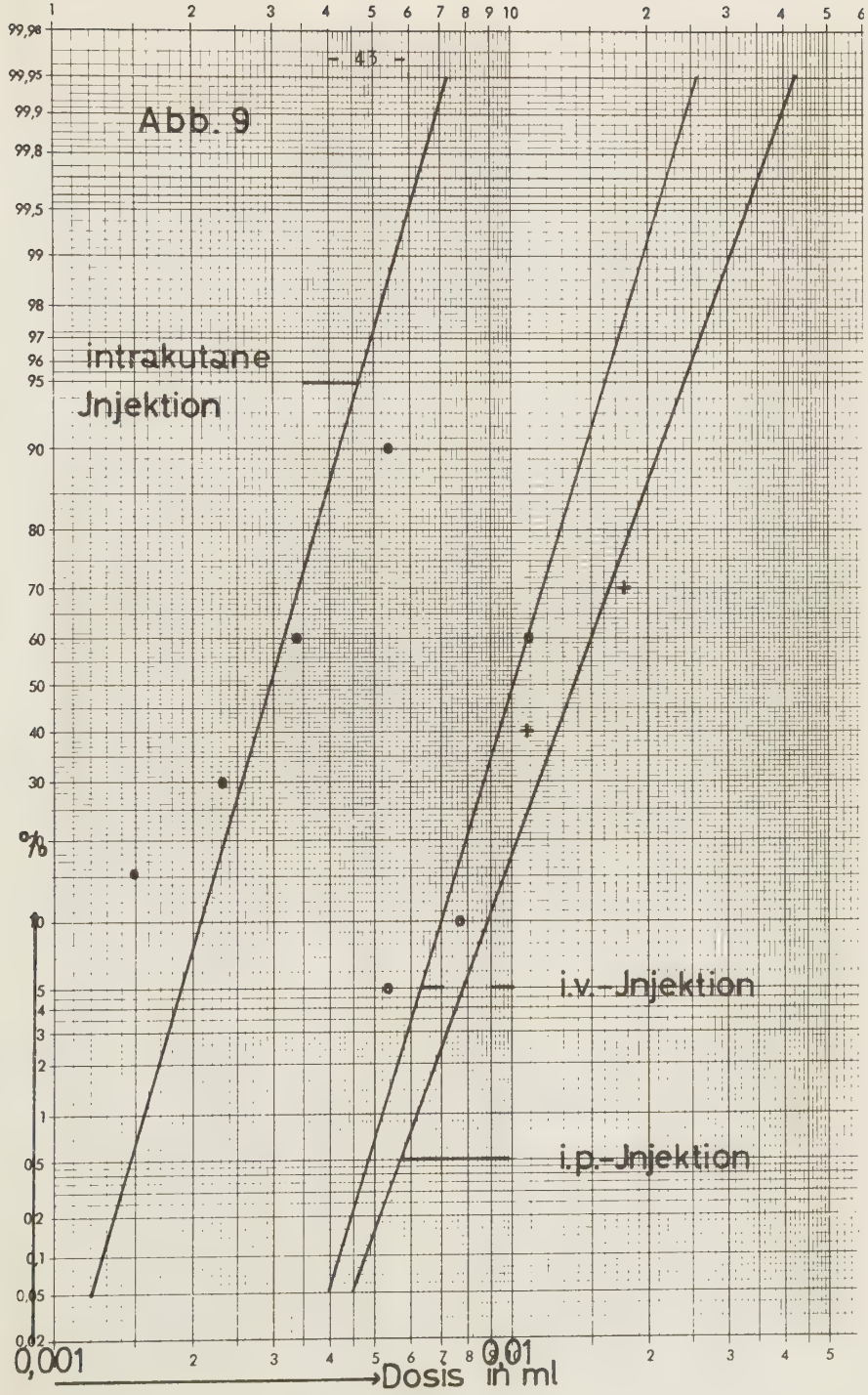


Abb. 9
intrakutane
Jnjektion
i.v.-Jnjektion
i.p.-Jnjektion
%
0,001
0,01
Dosis in ml

intravenöse Injektion (Maus) :

$$m = -1{,}5794 + \frac{1}{2} \times 0{,}1761 - 0{,}1761 \frac{265}{100}$$

Dlm_{50} = 0,0110 ml

intraperitoneale Injektion (Maus) :

$$m = -1{,}5794 + \frac{1}{2} \times 0{,}1761 - 0{,}1761 \frac{210}{100}$$

Dlm_{50} = 0,0140 ml

intracutane Injektion (Meerschweinchen) :

$$m = -2{,}1079 + \frac{1}{2} \times 0{,}1761 - 0{,}1761 \frac{295}{100}$$

Dnm_{50} = 0,0029 ml

Der Vertrauensbereich, der sich aus dem Standardfehler ergibt, liegt bei der

intravenösen Injektion zwischen
0,01273 ml und 0,00999 ml,
intraperitonealen Injektion zwischen
0,01560 ml und 0,00701 ml und
intracutanen Injektion zwischen
0,00331 ml und 0,00251 ml.

Diese Zahlen lassen den Schluß zu, daß die Toxinausbeute mit dem modifizierten Oxoid-Nährmedium nach Robertson wesentlich größer ist als die Ausbeute nach Beimpfung der CDB nach Logan. Diese Zahlen sehen so aus:

intravenöse Injektion (Maus) : Dlm_{50} = 0,021 ml,
intraperitoneale Injektion (Maus) : Dlm_{50} = 0,027 ml und
intracutane Injektion (Meerschweinchen): Dnm_{50} = 0,009 ml.
(s. Seite 36).

IV. Besprechung

Für den Nachweis der von den fünf Typen des Cl. welchii gebildeten Toxine hat die Unterscheidung von fünf Major- und sieben Minor-Toxinen einen erheblichen Fortschritt gebracht. Denn die Begrenzung der Differenzierung auf fünf Major-Toxine bedeutet eine Vereinfachung der Methodik, die für die routinemäßige Feststellung des Types wünschenswert ist.

Die Differenzierung der einzelnen Major-Toxine erfolgt mittels der Neutralisation durch Typ-Antiseren, deren Herstellung die Wellcome-Laboratorien in London übernommen haben. Als Indikator für die eingetretene oder ausgebliebene Neutralisation wird die Labor-Maus oder das Meerschweinchen verwendet. Bei der Maus gilt das Überleben, beim Meerschweinchen das Ausbleiben einer entzündlichen, nekrotisierenden Reaktion der Haut an der Injektionsstelle als Zeichen für die Neutralisation, wobei sicher gestellt sein muß, daß die Toxinverdünnung ohne Antiserum den Tod der Maus bzw. eine Hautnekrose beim Meerschweinchen hervorruft. Es kommt dem Nachweis der Major-Toxine zur Hilfe, daß jedes der Major-Toxine die Eigenschaft hat, auf die Maus letal und auf die Meerschweinchenhaut nekrotisierend zu wirken. Unklar ist, welcher der drei Teste zu reproduzierbaren Ergebnissen führt.

Die Wellcome-Laboratorien empfehlen den Intracutantest am Meerschweinchen mit der Injektionsdosis von 0,2 ml. Willis; Smith und Holdeman stellen den Letaltest an der Labor-Maus in den Vordergrund. Als Injektionsdosis werden jeweils 0,4 ml verwendet. Willis geht von der i.v.-Injektion dieser Dosis aus, während Smith und Holdeman die i.p.-Injektion empfehlen.

Beim Intracutantest am Meerschweinchen lassen sich bis zu 20 Injektionen an der enthaarten Haut durchführen, so daß der Reaktionskörper bei allen injizierten Toxinverdünnungen der gleiche ist. Individuelle Schwankungen

in den Ergebnissen sind daher bei dem Intracutantest weniger zu befürchten als beim Mäuseletaltest, bei dem man eine Anzahl von Mäusen für jede Verdünnungsstufe benutzt und jedes Tier verschieden reagieren kann.

Das Überleben der Maus innerhalb 24 Stunden post injectionem gilt beim i.v.-Test als Zeichen einer Neutralisation des Toxins durch das beigemischte Antiserum, während der Tod als Ausbleiben der Neutralisation gedeutet wird. Beim i.p.-Test wird das gleiche Prinzip zugrunde gelegt und eine 48stündige Beobachtungszeit der Tiere gefordert. Beim Intracutantest am Meerschweinchen gilt ein Fehlen einer nekrotisierenden Entzündung der Haut an der Stelle der Injektion nach 48 Stunden post injectionem als Zeichen der Neutralisation. Ist das Antiserum nicht imstande, das Toxin zu neutralisieren, wird an der Injektionsstelle eine Hautnekrose sichtbar.

Die individuelle Schwankung der Empfindlichkeit der einzelnen Mäuse gegenüber dem Toxin versucht man dadurch auszugleichen, daß man für jede Verdünnungsstufe ein größeres Mäusekollektiv verwendet, das der gleichen Zucht entstammt und aus Mäusen gleichen Gewichts zusammengestellt wird.

Die vorliegende Arbeit ist als ein Versuch zu werten, an gleichen, toxinhaltigen Kulturfiltraten die Ergebnisse der drei Teste miteinander zu vergleichen. Da für eine Neutralisation die Wirksamkeit des einzelnen Toxins die unabdingbare Voraussetzung ist, wurden lediglich die Ergebnisse der Toxinwirksamkeit, nicht aber die Ergebnisse der Neutralisation des Toxins miteinander verglichen. Die Kulturfiltrate wurden mit physiologischer Kochsalzlösung verdünnt und die noch wirksame Endstufe im Meerschweinchen- bzw. Mäusetest bestimmt. Um sicher zu stellen, daß nur die Wirksamkeit eines einzelnen Toxins im Tierversuch festgestellt wurde, bediente ich mich des alpha-Toxins, das als Rohkulturfiltrat mit einem Standardstamm A_1 unter Benutzung

des Logan-Nährmediums hergestellt worden war.

Die Art der Gewinnung des Filtrates schloß das Vorhandensein des vom A-Typ gebildeten, zweiten hämolysierend und letal wirkenden theta-Toxins - eines Minor-Toxins - aus, weil dieses Toxin sauerstofflabil ist (Todd; 1941) und die Gewinnung des Filtrates unter aeroben Bedingungen erfolgte. Die Beigabe extrahierter Ochsenherzmuskulatur und die Filtration des Kulturfiltrates durch ein Tiefenfilter waren weitere Faktoren, die es unwahrscheinlich machten, daß das theta-Toxin in den Testen noch zur Wirkung kommen konnte.

Um zu möglichst repräsentativen Ergebnissen im i.v.- bzw. i.p.-Mäuseletaltest zu kommen, wurde für jede Toxinverdünnung ein Mäusekollektiv von 20 Mäusen, deren Gewicht 18 bis 22 g je Maus betrug, verwendet.

Beim Intrakutantest am Meerschweinchen wurden für jede Verdünnungsstufe 20 Injektionen an 28 Meerschweinchen ausgeführt. Dabei zeigte sich, daß von den insgesamt 28 eingesetzten Tieren acht Meerschweinchen (= 28,9%) auf die Injektionen, auch mit den höchsten Dosen, überhaupt nicht reagierten und durch andere Meerschweinchen ersetzt werden mußten. Eine derartige Unempfindlichkeit für das alpha-Toxin konnte bei Mäusen nicht beobachtet werden.

Die vergleichenden Versuche ergaben, daß letale und nekrotisierende Wirkungen beim Meerschweinchen- und Mäusetest parallel laufen und somit die Auffassung verschiedener Autoren, daß beide Wirkungen einem einzigen Toxin zuzuschreiben sind, zutreffen dürfte.

Der Meerschweinchenintracutantest erwies sich als empfindlicher als der Mäuseletaltest in seiner i.v.- und i.p.-Variante. Jedoch waren die Schwankungen beim Meerschweinchentest stärker als beim i.p.-Mäuseletaltest.

Vergleicht man die Ergebnisse der zwei Mäuseteste, so läßt sich feststellen, daß der i.v.-Test zwar geringere

Mengen des Toxins anzeigte als der i.p.-Test, aber die Streuung der Ergebnisse war beim i.v.-Test stärker als beim i.p.-Test. Offenbar stellt die i.v.-Injektion von 0,4 ml für den Blutkreislauf der Maus eine stärkere Belastung dar als die i.p.-Injektion, wodurch die größere biologische Streuung der Ergebnisse des i.v.-Mäuseletaltestes zu erklären wäre.

Was die Technik der Durchführung der drei Teste anbelangt, so ist der Intracutantest bei weitem der arbeitsaufwendigste: zum Fixieren des Meerschweinchens ist eine Hilfsperson erforderlich. Ein Versuch, durch Vollnarkose eine Ruhigstellung der Tiere zu erzwingen und die Hilfsperson entbehrlich zu machen, mußte, da sich Todesfälle durch Überdosierung des Narkotikums nicht vermeiden ließen, aufgegeben werden.

Die Technik der i.v.-Injektion ist im Vergleich zur i.p.-Injektion etwas schwieriger. Ein Kästchen zum Festhalten der Maus ist notwendig, außerdem bedarf es einer längeren Einarbeitungszeit, bis die i.v.-Injektion in jedem Fall gelingt. Der i.p.-Test hat neben seiner größeren Genauigkeit den Vorzug der einfacheren Handhabung, wobei man die Maus mit der Hand in Rückenlage fixiert und mittels der Injektionsspritze das Kulturfiltrat ohne Hilfe intraperitoneal applizieren kann.

Daß die vergleichenden Untersuchungsergebnisse nicht durch Zufälle bedingt waren, konnte durch Testung eines zweiten Kulturfiltrates, das mit einer Modifikation des Oxoid-Nährbodens nach Robertson mittels Zugabe einer 25%igen Dextrinsuspension hergestellt worden war, erhärtet werden. Es trat bei den Testungen mit diesem Nährboden wiederum hervor, daß der Intracutantest am empfindlichsten war, aber eine stärkere Streuung aufwies und daß der i.p.-Test dem i.v.-Test bei der Maus überlegen war, weil der i.p.-Test die geringere Streuung der Ergebnisse zeigte.

Das durch Dextrinzusatz modifizierte Oxoid-Robertson-Nährmedium erzielte bei gleicher Bebrütungszeit und -Temperatur (5 Std. bei 37°C) mit dem Standardstamm A_1 ein wirksameres Kulturfiltrat als das Logan-Medium. Außerdem war es im Hinblick auf einfache Herstellung nicht zu übertreffen. Denn es steht ein Fertignährboden zur Verfügung, der kurz vor der Beimpfung noch einmal zum Austreiben der Luft aufgekocht wird und dem nach Abkühlung 2,5 ml einer 25%igen Dextrinsuspension pro 50 ml Nährbrühe zugefügt werden.

V. Zusammenfassung

1. Mit drei verschiedenen Kulturfiltratchargen eines A-Stammes des Cl. welchii wurden der Mäuseletaltest in seiner i.v.- und seiner i.p.-Variante mit dem Intracutantest am Meerschweinchen verglichen. Die Ergebnisse wurden in Dosis-Wirkungs-Kurven dargestellt und durch bio-mathematische Methoden die Dlm_{50} bzw. Dnm_{50} ermittelt.

2. Der Intracutantest beim Meerschweinchen leistet hinsichtlich der Empfindlichkeit gegenüber dem alpha-Toxin des Cl. welchii am meisten. Die Dnm_{50} liegt in jedem Fall am tiefsten. Seine biologische Streuung muß jedoch als relativ groß angesehen werden. Außerdem zeigten von insgesamt 28 eingesetzten Meerschweinchen acht Tiere (28,9%) auf die alpha-Toxininjektion hin keine Reaktion. Die Gründe für das Fehlen einer Reaktion sind noch nicht geklärt und bedürfen einer gesonderten Untersuchung.

3. Der intravenöse Mäuseletaltest leistet an Empfindlichkeit weniger als der Hautnekrosetest am Meerschweinchen, jedoch geringgradig mehr als der intraperitoneale Mäuseletaltest. Die Dlm_{50} liegt in der Nähe der Dlm_{50} des i.p.-Testes. Die biologische Streuung beim Mäuseletaltest ist groß: es liegt keine Normalverteilung der getesteten Reaktionen vor, was mit der Belastung des Kreislaufes bei dieser Injektionsmethode in Zusammenhang stehen dürfte.

4. Der Mäuseletaltest nach i.p.-Injektion reagiert von den drei untersuchten Testmethoden am wenigsten empfindlich. Seine Dlm_{50} liegt jedoch nur geringfügig unter derjenigen des i.v.-Mäuseletaltestes. Die biologische Streuung ist nicht so stark ausgeprägt, so daß dieser Test auch im Hinblick auf die Reproduzierbarkeit am günstigsten zu bewerten ist. Beim Ver-

gleich der Kulturfiltrate, die mit einem modifizierten Robertson- und einem Logan-Nährmedium hergestellt worden waren, erzielten alle durchgeführten Teste (Hämolyse-Röhrchen-Test, Lecitho-Vitellin-Test und die drei Testmethoden am Tier) mit dem Robertson-Nährmedium mit Dextrinzusatz bessere Ergebnisse als mit dem Logan-Nährmedium.

5. Für die praktische Anwendbarkeit einer der drei Testmethoden am Tier empfehle ich den Mäuseletaltest in seiner i.p.-Injektionsform, sofern genügend Toxin im Kulturfiltrat vorhanden ist. Bei geringen Mengen an Toxin sollte der Hautnekrosetest am Meerschweinchen benutzt werden. Er reagiert empfindlicher, aber seine Unhandlichkeit und der vermehrte Aufwand, den er erfordert, lassen diesen Test nur in besonderen Fällen empfehlenswert erscheinen. Der i.v.-Mäuseletaltest erfüllt die Erwartungen nicht; er reagiert zwar ähnlich empfindlich wie der i.p.-Test an der Maus, seine Streuung jedoch läßt eine Reproduzierbarkeit der Ergebnisse nicht immer zu. Im übrigen ist der i.p.-Test schneller und leichter durchzuführen.

Zur Gewinnung von alpha-Toxin mit Cl. welchii dürfte ein modifizierter Oxoid-Nährboden nach Robertson besser geeignet sein als das bisher im Institut benutzte Medium nach Logan.

VI. Literaturverzeichnis

1. Adams, M.H. u. Hendee, E.D. — Methods for the production of the alpha and theta toxins of Clostridium welchii. J. Immunol., 51, 249 (1945)

2. Aikat, B.K. u. Dible, J.H. — The pathology of Clostridium welchii infection. J. Path. Bact., 71, 461 (1956)

3. Batty, J. — Routine typing of Clostridium welchii (perfringens). (Informationsblatt) Burroughs Wellcome & Co, London (1970)

4. Beer, J. u. Al-Khatib, G. — Zum Nachweis und zur Differenzierung pathogener Clostridien und ihrer Toxine. Mh. Vet. Med., 23, 709 (1968)

5. Bengtson, T.A. — zit. nach Oakley, C.L. The toxins of Clostridium welchii. A critical review. Bull. Hyg., 18, 781 (1943)

6. Bull, C.G. u. Pritchett, I.W. — Identity of the toxins of different strains of Bacillus welchii and factors influencing their production in vitro. J. exp. Med., 26, 867 (1917)

7. Dalling, T. u. Ross, H.E. — Clostridium welchii: Notes on the relationship between the types of cultures and the production of toxin. J. Comp. Path., 51, 235 (1938)

8. Dalling, T., Glenny, A.T., Mason, J.H. u. O'Brien, R.A.
zit. nach Oakley, C.L. The toxins of Clostridium welchii. A critical review Bull. Hyg., 18, 781 (1943)

9. Elder, J.M. u. Miles, A.A.
The action of the lethal toxins of gas gangrene clostridia on capillary permeability J. Path. Bact., 74, 133 (1957)

10. Ellner, P.D.
Fate of partially purified C^{14}-labelled toxin of Clostridium perfringens J. Bact., 82, 275 (1961)

11. Franke, F.
Intracutanteste mit Toxinfiltraten von Cl. welchii an immunisierten Meerschweinchen unter besonderer Berücksichtigung der Typendifferenzierung Vet. med. Diss. Berlin F.U. (1968)

12. Frazer, A.C., Elkes, J.J., Sammons, H.G., Govan, A.D.T. u. Cooke, W.T.
Effects of Cl. welchii type A toxin on body tissues and fluids Lancet, 1, 457 (1945)

13. Fuchs, A.-R. u. Bondé, G.J.
The nutritional requirements of Clostridium perfringens J. Gen. Microbiol., 16, 317 (1957)

14. Gale, E.F. u. Van Heyningen, W.E.
The effect of the pH and presence of the glucose during growth on the production of alpha- and theta-toxins and hyaluronidase by Clostridium welchii Biochem. J., 36, 624 (1942)

15.Glenny, A.T., Barr,M., Llewellyn-Jones, M., Dalling, T.u. Ross, H.E.
Multiple toxins produced by some organisms of the Cl. welchii group
J. Path. Bact., 37, 53 (1933)

16.Hartwigk, H. u. Chenitir, H.
Der Nachweis des Alpha-Toxins von Cl. welchii durch Testblättchen
Zbl. Vet. Med. B, 16, 266 (1969)

17.Heyningen, W.E. Van
The biochemistry of the gas gangrene toxins
I. Estimation of the alpha-toxin of Cl. welchii type A
Biochem. J., 35, 1246 (1941)

18.Holland, U.
Studien über die Tetanustoxingewinnung
Vet. med. Diss. Berlin F.U. (1971)

19.Kellaway, C.H. u. Trethewie, E.R.
Tissue injury by the toxin of Cl welchii type A
Aust. J. exp. Biol. med. Sci., 19, 17 (1941)

20.Kielley, W.W. u. Meyerhof, O.
Studies on adenosinetriphosphatase of muscle.
II. A new magnesium-activated adenosinetriphosphatase
J. Biol. Chem., 176, 591 (1948)

21.Kielley, W.W. u. Meyerhof, O.
Studies on adenosinetriphosphatase of muscle.
III. The lipoprotein nature of the magnesium activated adenosinetriphosphatase
J. Biol. Chem., 138, 391 (1950)

22.Klose, F.
Toxin-Antitoxin Studien mit dem Fraenkel'schen Gas-Bazillus
Münch. med. Wschr., 63, 723 (1916)

23. Logan, M.A., Tytell, A.A., Danielson, I.S. u. Griner, A.M.
Production of Clostridium perfringens alpha toxin
J. Immunol., 51, 317 (1945)

24. Macfarlane, M.G.
The biochemistry of bacterial toxins. 5. Variation in haemolytic activity of immunologically distinct lecithinases towards erythrocytes from different species
Biochem. J., 47, 270 (1950)

25. Macfarlane, M.G. u. Knight, B.C.J.G.
The biochemistry of bacterial toxins. I. The lecithinase activity of Cl. welchii toxins
Biochem. J., 35, 884 (1941)

26. Macfarlane, R.G., Oakley, C.L. u. Anderson, C.G.
Haemolysis and the production of opalescence in serum and lecithovitellin by the alpha-toxin of Clostridium welchii
J. Path. Bact., 52, 99 (1941)

27. Mason, J.H.
The thermostability of the toxic components of Clostridium welchii type A
S. Afr. J. Med. Sci., 12, 61 (1947)

28. Nagler, F.P.O.
Observations on a reaction between the lethal toxin of Cl. welchii (type A) and human serum
Brit. J. Exp. Path., 20, 473 (1939)

29. Nishida, S., Murakami, M. u. Yamagishi, T.
Chopped meat broth as a medium for the production of toxins by clostridia.
I. Production of toxins by Clostridium welchii
Jap. J. Microbiol., 6, 33 (1961)

30.Oakley, C.L. — The toxins of Clostridium welchii. A critical review. Bull. Hyg., 18, 781 (1943)

31.Oakley, C.L. u. Warrack, G.H. — Factors affecting the activity of the alpha-toxin of Cl. welchii. J. Path. Bact., 53, 335 (1941)

32.Oakley, C.L. u. Warrack, G.H. — Routine typing of Clostridium welchii. J. Hyg., 51, 102 (1953)

33.Pivnick, H., Habeeb, A.F.S.A., Gorenstein, G., Stuart, P.F. u. Hauschild, A.H.W. — Effect of pH on toxinogenesis by Clostridium perfringens type C. Canad. J. Microbiol., 10, 329 (1963)

34.Schloßberger, H. u. Menk, W. — Wertbemessung der antitoxischen Gasödemsera. Zbl. Bakt. I Orig., 114, 334 (1929)

35.Schmude, D.E. von — Vergleich der alpha-Toxinbildung von A-Stämmen des Clostridium welchii in zwei von Logan und Mitarbeitern empfohlenen Nährmedien. Vet. med. Diss. Berlin F.U. (1971)

36.Seiffert, G. — Eine Reaktion menschlicher Sera mit Perfringenstoxin. Zschr. Immun.-forsch., 96, 515 (1939)

37.Smith, L.DS. u. Gardner, M.V. — The inhibition of the lecithinase of Clostridium perfringens by some reducing agents. J. Franklin Inst., 250, 465 (1950)

38.Smith, L.DS. u. Holdeman, L.V. — The pathogenic anaerobic bacteria. Thomas, Springfield, Ill., USA (1968)

39.Ssilanowa, I.W. Zur intracutanen Wertbestimmung der Gasödemtoxine und Gasödemsera (Anti-Perfringens, Anti-Histolytikus und Anti-Vibrio-Septique) am Kaninchen
Zbl. Bakt. I Orig., 133, 149 (1934)

40.Taylor, A.W. u. Stewart, J. The toxins produced by Clostridium welchii in a simple medium
J. Path. Bact., 53, 87 (1941)

41.The Oxoid Manual of Culture Media 2. Ed.
The Oxoid Division, Oxo. Ltd. London (1962) S. 218

42.Todd, E.W. The oxygen-labile haemolysin or θ-toxin of Clostridium welchii
Br. J. exp. Path., 22, 172 (1941)

43.Tzeknowitzer, M. u. Karrouth, T. zit. nach Oakley, C.L.
The toxins of Clostridium welchii
A critical review
Bull. Hyg., 18, 781 (1943)

44.Walbum, L.E. u. Reyman, C.G. The production of toxins by Clostridium welchii
J. Path. Bact., 36, 469 (1933)

45.Willis, A.T. Clostridia of wound infection
Butterworth, London (1969)

46.Willis, A.T. u. Hobbs, G. Some new media for the isolation and identification of clostridia
J. Path. Bact., 77, 511 (1959)

47.Wilsdon, A.J. Observation on the classification of Bacillus welchii
Rep. Inst. Anim. Path. Univ. Cambridge, 2, 53 (1931)

48.Zamecnik, P.C., Nathanson, I.T. u. Aub, J.E. Physiologic action of Clostridium welchii (Typ A)-toxins in dogs
J. clin. Invest., 26, 394 (1947)

Herrn Professor Dr. H. Hartwigk möchte ich für die Überlassung des Themas und die mir immer gewährte großzügige Unterstützung herzlich danken.

Allen Mitarbeitern des Institutes, besonders Herrn Dr. Konstantin Katsaras, sei für ihre jederzeit erwiesene Hilfsbereitschaft ebenfalls gedankt.

L e b e n s l a u f

Am 1. Mai 1945 wurde ich, Claus-Norbert Fink, als Sohn des aktiven Offiziers Claus Fink und seiner Ehefrau Wilma, geb. Daehre im Kriegsentbindungsheim Molchow Kreis Ruppin geboren.

Im Jahre 1951 wurde ich in die zehnte Grundschule Berlin-Wilmersdorf eingeschult.

Dort blieb ich bis zur Umschulung 1957 in die Schulfarm Scharfenberg, die ich am 24. Februar 1964 mit dem Reifezeugnis verließ.

Vom April 1964 bis Oktober 1964 volontierte ich bei der Berliner Volksbank. Seit dem Wintersemester 1964 studierte ich Veterinärmedizin an der Freien Universität Berlin.

Nach dem bestandenen Vorphysikum in Berlin setzte ich mein Studium vom Sommersemester 1965 bis zum Sommersemester 1967 an der Justus Liebig Universität, Gießen, fort, wo ich nach dem Wintersemester 1967 mein Physikum ablegte.

Seit dem Wintersemester 1967/68 studierte ich wieder an der Freien Universität Berlin. Dort legte ich nach dem Wintersemester 1969/70 das Staatsexamen ab und erhielt am 24. April 1970 die Bestallung.

Seitdem arbeite ich mit Hilfe eines Promotionsstipendiums an meiner Dissertationsarbeit im Institut für Veterinär-Hygiene.